

И.В. МАЙБОРОДИН ¹, А.А. ШЕВЕЛА ¹, С.В. МАРЧУКОВ ¹,
В.В. МОРОЗОВ ¹, В.А. МАТВЕЕВА ¹, В.И. МАЙБОРОДИНА ²,
А.М. НОВИКОВ ³, А.И. ШЕВЕЛА ¹



РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНОГО ДЕФЕКТА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук ¹,
Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины
Министерства науки и высшего образования РФ,
Институт молекулярной патологии и патоморфологии ²,
АО Медицинский центр «Авиценна» ³, г. Новосибирск,
Российская Федерация

Цель. Изучить результаты применения экстрацеллюлярных микровезикул мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения крысы (ЭМВ) для регенерации дефекта костной ткани кроликов, а также получить данные о сохранности ЭМВ в тканях после их введения.

Материал и методы. В проксимальных мыщелках большеберцовой кости беспородных кроликов создавали дефект диаметром 2 мм и глубиной 4 мм. На левой конечности дефект заполняли физиологическим раствором, на правой конечности в дефект вводили 50 мкг ЭМВ.

Результаты. К 12-м суткам в контроле у всех кроликов сохранялся дефект в костной ткани с формирующимися костными структурами и грубым толстым рубцом на границе с неповрежденными участками. После введения ЭМВ в большинстве случаев повреждение кости не было найдено, рубец был тонким, с упорядоченными структурами межклеточного матрикса. Спустя 12 суток после применения ЭМВ, меченых Vybrant® CM-Dil, в надкостнице и рядом с ней, костном мозге, сосудах костной ткани были найдены единичные, очень мелкие, пылевидные объекты, флуоресцирующие красным цветом на фоне применения фильтра для родамина. Иногда был отмечен четкий красный оттенок включений в крупных клеточных элементах — макрофагах. К 21-му дню справа (опыт) в 4 случаях из 5 на месте дефекта костной ткани были найдены только структуры рубца, тогда как слева (контроль) — только в 2 наблюдениях из 5.

Заключение. Предварительные результаты применения ЭМВ для регенерации дефекта костной ткани в эксперименте свидетельствуют о более быстром заживлении, увеличении частоты успешной регенерации поврежденной кости и формировании менее грубой костной мозоли. У кроликов ЭМВ присутствуют в тканях в месте применения не менее 12 суток. Часть введенных ЭМВ оказывается в макрофагах.

Ключевые слова: костная ткань, регенерация костной ткани, экстрацеллюлярные микровезикулы, макрофаги, люминесцентная микроскопия

Objective. To study the results of application extracellular microvesicles from rat multipotent mesenchymal stromal cells of the bone marrow origin (EMV) for the regeneration of rabbit bone defects, as well as to obtain data about the EMV preservation after their introduction into tissues.

Methods. The bone defect (2 mm diameter and 4 mm depth) was created in the proximal condyles of the outbred rabbit tibia. On the left limb the bone defect was filled with saline, on the right — the 50 g EMV were introduced into defect.

Results. By the 12th day all control rabbits had retained a defect in the bone tissue with forming bone structures and hypertrophic scar in the border with intact areas.

In the most cases after the EMV introduction, no bone damage was found; the scar was thin with ordered structures of the intercellular matrix. 12 days after the application of Vybrant® CM-Dil-labeled EMV, in the periosteum and in adjacent bone marrow, vessels of bone tissue the single, very small, dust-like objects were found fluorescent in red on the background of rhodamine filter use. Sometimes the clear red tint of inclusions was noted in large cellular elements — macrophages. By the 21st day on the right (experimental), in 4 cases out of 5, only scar structures were found at the site of the bone tissue defect, while on the left (control) — only in 2 cases out of 5.

Conclusion. The preliminary results of the EMV application for the bone regeneration defect revealed the faster healing, the frequency of successful regeneration of the damaged bone and the formation of a less rough bone callus. In rabbits EMV are present in tissues at the site of application for at least 12 days. The number of the introduced EMV was found in macrophages.

Keywords: bone tissue, bone tissue regeneration, extracellular microvesicles, macrophages, luminescent microscopy

**Научная новизна статьи**

Впервые показано, что после экспериментального применения экстрацеллюлярных микровезикул мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ЭМВ) для регенерации дефекта костной ткани происходит более быстрое заживление, увеличение частоты успешной регенерации поврежденной кости и формирование менее грубой костной мозоли. У кроликов ЭМВ присутствуют в тканях в месте применения не менее 12 суток. Часть введенных ЭМВ оказывается в макрофагах.

What this paper adds

It was shown firstly that after the experimental application of extracellular microvesicles of multipotent mesenchymal stromal cells (EMV) for the regeneration of a bone tissue defect, a wound healed faster, and high frequency regeneration of damaged bone and the formation of less coarse callus were achieved. EMV is present in the rabbit tissues at the site of application for at least 12 days. Part of the introduced EMV was found in macrophages.

Введение

Мультипотентные стволовые/стромальные клетки (МСК) широко использовали для тканевой регенерации, в том числе и для восстановления костных дефектов. Однако недостатки их применения, включая ограниченный срок существования в тканях, стали препятствием для дальнейшей прямой трансплантации МСК с целью репарации.

Клетки влияют друг на друга и обмениваются функциональными белками и генетическим материалом через секрецию экзосом, которые можно применять для влияния на регенерацию тканей [1].

Экзосомы и эктосомы являются основными компонентами экстрацеллюлярных микровезикул (ЭМВ).

Экзосомы — это сравнительно небольшие мембранные пузырьки (от 50 до 100 нм в диаметре), образующиеся из эндосомальных мультивезикулярных телец в результате их слияния с поверхностной мембраной клетки [2]. Эктосомы, или почкующиеся микровезикулы, представляют собой довольно крупные объекты (от 50 до 1000 нм в диаметре). Они образуются из выпячиваний плазматической мембраны из клетки наружу с последующим отделением образовавшегося пузырька от клетки [3]. В отличие от экзосом, эктосомы хорошо связываются с аннексином V и могут взаимодействовать с протромбином и фактором свертывания крови X с образованием протромбиназного комплекса и запускать коагуляцию крови [4].

Внеклеточные экзо- и эктосомы секретируются различными типами клеток и участвуют в физиологических и патофизиологических процессах. ЭМВ опосредуют межклеточные связи и содержат сигнальные органоиды, которые передают точную информацию от определен-

ной клетки к клеткам-мишеням. В результате этих свойств экзосомы определенных типов клеточных элементов могут служить новыми инструментами для различных терапевтических подходов, включая терапию опухоли, вакцинацию, иммуномодуляторную и регенеративную терапию, адресную доставку лекарственных средств и т.п. [5].

Экзосомы оказывают влияние на судьбы клеток, в частности, экзосомы выступают в качестве индукторов дифференцирования МСК в определенном направлении. Возможным механизмом ускорения репарации тканей экзосомами является доставка микроРНК. Проостеогенные экзосомы, изолированные из различных клеточных культур, вызывают соответствующее дифференцирование наивных МСК. Кроме того, экзосомы могут также связываться с матричными белками, такими как коллаген типа I и фибронектин, расширяя их возможности, как биоматериалов [1, 6].

Паракриновые релизы, секретируемые костномозговыми МСК, играют главную роль в восстановлении поврежденных тканей, регулирующие цитокины являются критическим модулятором тканевой регенерации. Экзосомы содержат белки и нуклеиновые кислоты и работают как дополнительный модулятор межклеточного взаимодействия в процессе репарации тканей [7].

Цель. Изучить результаты применения ЭМВ мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения крысы (ЭМВ ММСК) для регенерации дефекта костной ткани кроликов, а также получить данные о сохранности и длительности существования ЭМВ ММСК в тканях после их введения.

Материал и методы

Работа основана на результатах морфологического исследования регенерации тканей

проксимального мыщелка большеберцовой кости 10 беспородных кроликов в разные сроки после введения ЭМВ ММСК крысы в стандартизованный дефект. Все манипуляции не были связаны с причинением боли животным и были проведены с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Получение, культивирование и характеристики МСК, выделение и окрашивание ЭМВ ММСК

МСК выделяли у крысы-самца инбредной линии Wag весом 180 г, возрастом 6 месяцев, характеризовали и культивировали в соответствии с нашими прошлыми работами [8].

Кондиционную среду собирали на стадии стационарного роста стабильной культуры 3-го пассажа при достижении конfluenceности клеточного монослоя 80%-90%.

Для окрашивания Vybrant CM-DiI компонентов мембраны ЭМВ ММСК из флаконов с МСК сливали ростовую среду и клетки споласкивали раствором Дальбекко. МСК заливали красителем Vybrant CM-DiI Cell-Labeling Solutions, разведенным 1:200 средой без сыворотки, и инкубировали 20 мин. при 37°C в CO₂-инкубаторе с 5% содержанием CO₂, в условиях повышенной влажности. После инкубации среду с красителем удаляли, МСК ополаскивали раствором Дальбекко, заливали ростовой средой и продолжали культивировать.

Через сутки после окрашивания Vybrant CM-DiI, МСК переводили на среду IMDM с 0,5% альбумином человека, 2мМ Glutamax[™], антибиотиком/антимикотиком и продолжали культивировать в течение 48 часов в указанных условиях для получения кондиционной среды, из которой выделяли ЭМВ ММСК. Для экстракции ЭМВ ММСК из кондиционной среды после культивирования МСК использовали дифференциальное центрифугирование. Среду подвергали последовательным центрифугированиям для удаления мертвых клеток и дебриса: 10 мин. при 300g, 10 мин. при 2000g, 30 мин. при 12 000g и 2 часа при 100 000g, перенося супернатант в новые пробирки после каждого центрифугирования. Полученный после ультрацентрифугирования осадок с ЭМВ ММСК ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора на фосфатном буфере, количество ЭМВ ММСК определяли по содержанию белка в осадке, использовали коммерческий набор «Qubit protein assay kit, Q33211» и флуориметр «Qubit[®] 2.0» (Invitrogen by life Technologies).

Хирургическое вмешательство по моделированию дефекта костной ткани и введение ЭМВ ММСК

В асептических условиях при использовании тотальной внутривенной анестезии пропофолом в проксимальных мыщелках большеберцовой кости 10 беспородных кроликов стоматологическим бором диаметром 2 мм с охлаждением стерильным физиологическим раствором создавали стандартизованное отверстие глубиной 4 мм.

Далее на левой конечности дефект кости инсулиновым шприцем заполняли забуференным физиологическим раствором (контроль) [9], на правой конечности в дефект вводили ЭМВ ММСК в теплом физиологическом растворе (опыт). Для исследования применена доза ЭМВ ММСК в 50 мкг на одно отверстие, исходя из средних данных, рекомендованных другими исследователями: 10-20 мкг/мл [10]; 0,6 мкг, 5 мкг и 50 мкг [11]; 100 мкг сразу после операции и еженедельно в течение 12 недель [9]. Через 20-30 секунд (для предотвращения выливания суспензии ЭМВ ММСК из дефекта) послойно викрилом 5-0 ушивали операционную рану. Кожные швы обрабатывали 5% спиртовым раствором йода.

Подготовка объектов для изучения морфологическими методами

Для морфологического изучения через 12 и 21 день (5 животных на каждый срок) после введения ЭМВ ММСК образцы поврежденной кости с окружающими тканями фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 часов, декальцинировали в растворе «Биодек R» (Bio Optica Milano, Италия), обезживляли и просветляли в растворе Изопреп (Биовитрум, Россия), заключали в гистопласт. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, изучали на световом микроскопе Axioimager M1 (Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз. Так как использованные кролики не являлись линейными животными, процессы репарации сравнивали у каждой особи отдельно, между правой (опыт) и левой (контроль) конечностями.

Кроме того, на 12-е сутки неокрашенные срезы исследовали в режиме люминесценции указанного микроскопа при увеличении до 1200 раз с фильтрами Alexa Fluor 488 (диапазон возбуждения 450-490 нм, диапазон регистрации 515-∞ нм) или для родамина (Rhod — диапазон возбуждения 540-552 нм, диапазон регистра-

ции 575–640 нм). Изучение тканей в условиях воздействия ультрафиолетовым светом через фильтр Alexa Fluor 488 было предпринято для получения зеленой фоновой аутофлюоресценции, что дает, во-первых, хорошее контрастирование объектов с люминесценцией при установке фильтра для родамина (красный цвет и его оттенки хорошо видны на зеленом фоне), а во-вторых, имеется возможность получить представление о структуре исследуемых тканей и местоположении светящихся красным цветом объектов в том или ином органе.

При получении микрофотографий использовали автоматическую экспозицию, в процессе совмещения изображений с применением фильтров Alexa Fluor 488 и для родамина можно получить зеленый и красный (или оранжевый и желтый) цвета в зависимости от преобладания интенсивности свечения при том или ином фильтре. Зеленый цвет дает более яркая флюоресценция при использовании фильтра Alexa Fluor 488, красный цвет возникает на фоне применения родаминового фильтра, желтый и его оттенки получаются в результате смешения зеленого и красного цветов в той или другой пропорции.

Результаты

Спустя 12 суток ни у одного животного из 5 визуально на коже не было гнойных осложнений, часть кроликов самостоятельно избавилась от швов на коже. В большинстве случаев (3 из 4; 75%) со стороны введения ЭМВ ММСК репарация шла быстрее, и часто дефект костной ткани визуально полностью регенерировал. В одном наблюдении, наоборот, заживление поврежденных тканей шло быстрее в контроле. Еще в одном случае в полости левого коленного сустава был найден большой объем прозрачной жидкости, возможно, в результате случайного повреждения коленного сустава, в связи с чем провести сравнение между правой и левой сторонами (опыт и контроль) было невозможно.

Микроскопически на этом сроке в контроле у всех 4 кроликов сохранялся дефект в костной ткани с формирующимися костными структурами и грубым толстым рубцом на границе с неповрежденными участками. Снаружи костный дефект был полностью закрыт грубоволокнистой соединительной тканью надкостницы с большим числом полнокровных тонкостенных кровеносных сосудов, скорее всего, грануляций. Далее кнаружи были расположены визуально интактные структуры сухожилий, прикрепленные к соответствующим участкам мышечка (рис. 1 А, Б).

У 3 животных на конечности справа (после введения ЭМВ ММСК) можно было установить только по структурам кости с измененной плотностью и рубцовыми изменениями, а также рубцам в близлежащих мягких тканях. Необходимо отметить, что рубец костной ткани в этих случаях был тонким, с упорядоченными структурами межклеточного матрикса (рис. 1 В, Г).

В процессе поиска меченых Vybrant® CM-Dil объектов при использовании режима люминесценции ввиду небольшого размера и числа ЭМВ ММСК на единицу площади среза ткани приходилось фотографировать многочисленные участки регенерирующей кости с использованием фильтров Alexa Fluor 488 и для родамина. Вместе с этим большинство объектов, окрашенных Vybrant® CM-Dil и, следовательно, со значительной преимущественной флюоресценцией при установке родаминового фильтра, найдено случайно.

Спустя 12 суток после применения ЭМВ ММСК в надкостнице и рядом с ней, в костной ткани, в сосудах, проходящих в кости, а также в прилежащем к участку повреждения костном мозге все-таки были найдены единичные очень мелкие пылевидные объекты, светящиеся красным цветом, что связано с преимущественной люминесценцией на фоне применения фильтра для родамина (рис. 1 Д, Е) в результате окрашивания Vybrant® CM-Dil. Часто было заметно, что такие структуры имели разный размер и разную яркость люминесценции (рис. 1 Д, Е). Кроме того, иногда был отмечен четкий красный оттенок включений в крупных клеточных элементах, скорее всего, макрофагах (рис. 1 Ж, З).

К 21 дню все кролики самостоятельно избавились от швов, также ни у одного животного из 5 не было гнойных осложнений, в том числе под кожей и под надкостницей. На большеберцовой кости справа (опыт) в 4 случаях из 5 признаков операции не было заметно, тогда как слева (контроль) — только в 2 из 5. Макроскопически последствия операции представляли собой гематомы (или имбибицию тканей эритроцитами), причем слева объем таким образом измененных тканей был больше.

Гистологически в случаях полного заживления (2 случая из группы контроля и 4 — после введения ЭМВ ММСК) на месте дефекта костной ткани были найдены структуры рубца (костной мозоли) (рис. 2 А, Б).

В 3 случаях, после введения физиологического раствора в моделированное отверстие кости, дефект сохранялся. Размеры остающегося дефекта были разными, иногда отверстие было похоже на псевдокисту с прозрачным со-

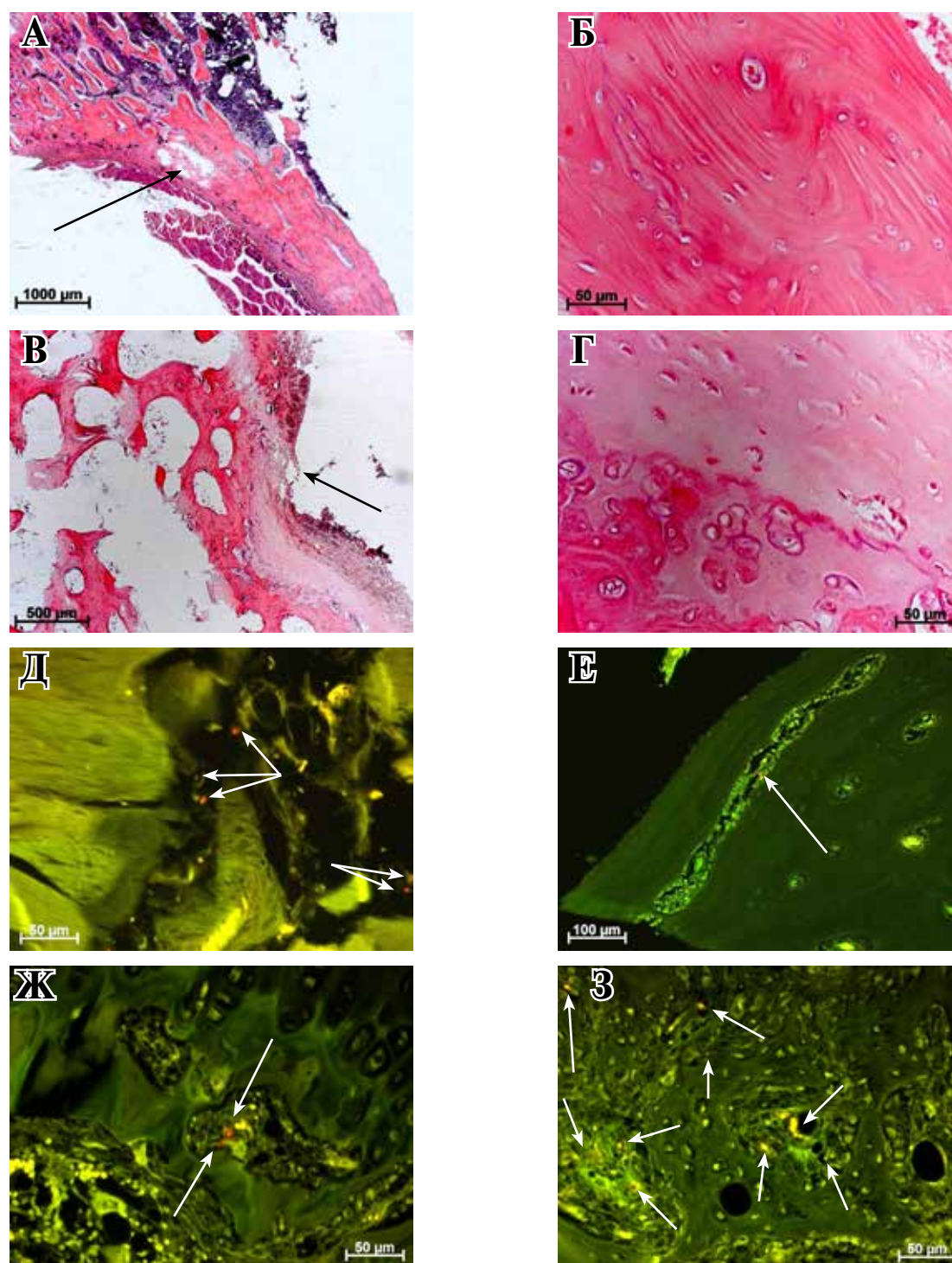


Рис. 1. Состояние дефекта костной ткани задней конечности кролика (животное 2) через 12 суток после применения ЭМВ ММСК крысы. А, Б, В, Г — Окраска гематоксилином и эозином. Д, Е, Ж, З — результат компьютерного совмещения изображений, полученных в люминесцентном режиме микроскопа с применением фильтров Alexa 488 и для родамина. А — в левой кости (контроль), непосредственно под надкостницей с большим числом полнокровных тонкостенных сосудов, сохраняется дефект (стрелка), в котором расположены небольшие костные структуры; Б — по периферии дефекта в контроле формируется грубый костный рубец; В — дефект костной ткани справа (опыт) отсутствует, но имеются изменения плотности и толщины кости, надкостницы и мягких тканей в месте операции (стрелка); Г — структуры рубца правой кости тонкие и упорядочены; Д — несколько мелких, интенсивно флуоресцирующих красным цветом объектов рядом с надкостницей (стрелки) справа; Е — единственный яркий красный объект в сосуде (стрелка) правого проксимального мышечка большеберцовой кости; Ж — крупные объекты красного цвета среди структур костного мозга в области повреждения правой кости (стрелки); З — объекты разных размеров и форм с красным оттенком флуоресценции среди структур костного мозга в регенерирующей костной ткани справа (стрелки).

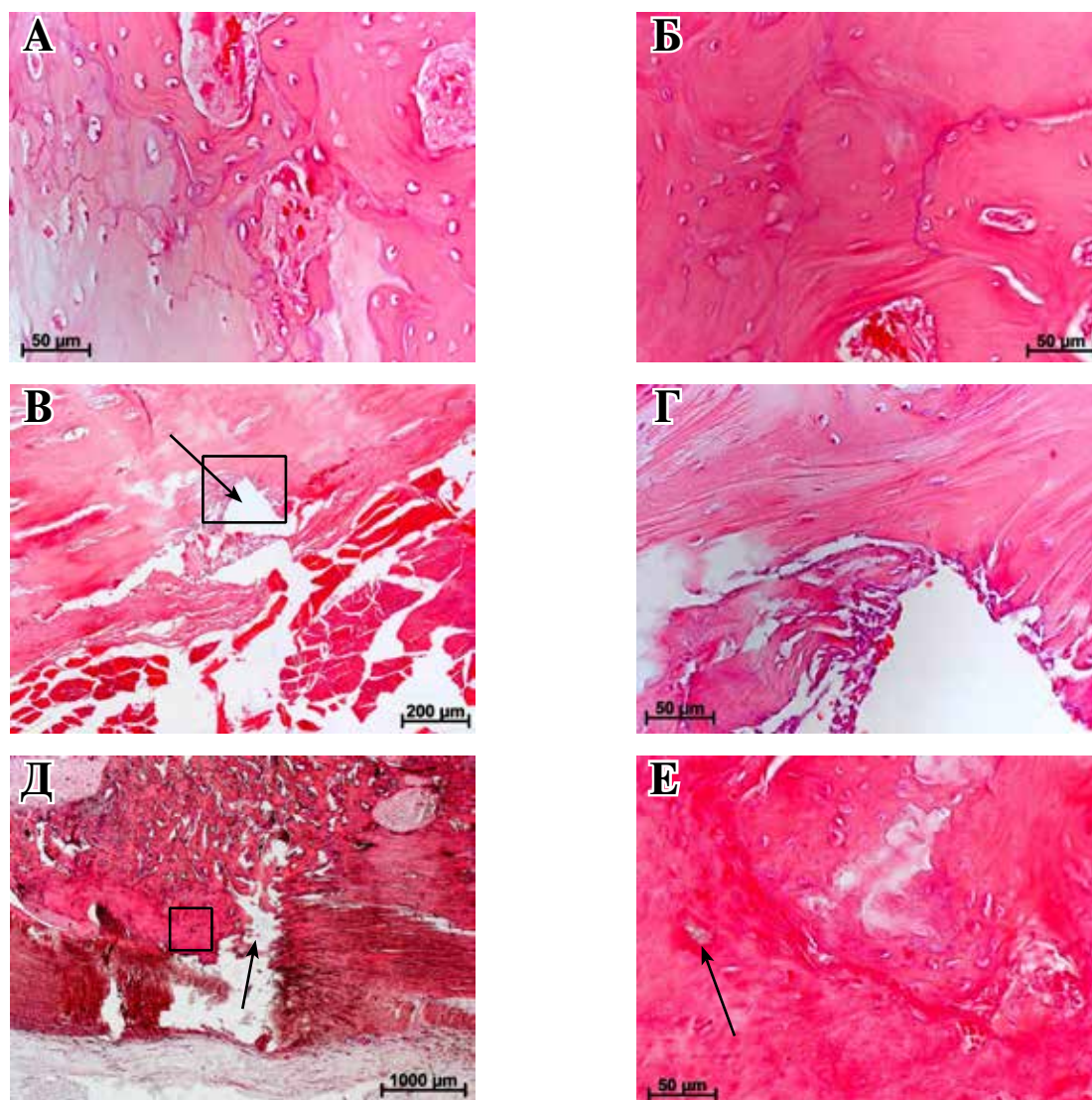


Рис. 2. Результаты регенерации участка повреждения проксимального мышелка большеберцовой кости кроликов спустя 21 день после введения ЭМВ ММСК крысы. Окраска гематоксилином и эозином. А – рубцовая ткань, содержащая множество кровеносных сосудов, на месте дефекта костной ткани левой конечности (контроль); Б – тонкие и упорядоченные структуры костной мозоли справа (опыт); В – в кости и надкостнице слева сохраняется дефект (стрелка); Г – фрагмент рис. 2 В. Края дефекта склеротически изменены, выстланы уплощенными клеточными элементами. На некотором отдалении от места повреждения имеются признаки формирования костной мозоли. Д – дефект правой кости небольшой (стрелка), но нет признаков регенерации надкостницы и сухожилий, прикрепляющихся к мышелку в месте операции. Е – фрагмент рис. 2 Д. В костной ткани, сформированной в дефекте, балки расположены хаотично, содержат большое число крупных клеточных элементов, похожих на остеобласты. Часто структуры кости перемежаются с неоформленной соединительной тканью, в которой расположены кристаллоподобные бесцветные оптически прозрачные тела со слабой клеточной реакцией вокруг (стрелка).

держимым, выстланную уплощенными клеточными элементами. Воспалительной клеточной инфильтрации найдено не было, что свидетельствует об отсутствии бактериальной контаминации. Края дефекта были представлены костной тканью с признаками склероза и образования рубца, что указывает на длительные, идущие параллельно процессы формирования новой костной ткани и ее лизисом. На некотором отдалении от дефекта кость также имела признаки рубцовых изменений (рис. 2 В, Г).

После использования ЭМВ ММСК в 1 наблюдении также был найден дефект костной ткани. Причем сохранялось повреждение не только кости, но и надкостницы и сухожилий, отходящих от мышелка. Целостность кожи и подкожной клетчатки была восстановлена. Костная ткань рядом с дефектом имела выраженные рубцовые изменения с хаотичным расположением костных балок и небольшими полостями. На значительных участках возле повреждения и на некотором отдалении костные

структуры содержали большое число остеобластов, часто костные балки перемежались со структурами неоформленной соединительной ткани. Следует обратить внимание на небольшие бесцветные инородные тела, похожие на кристаллические образования со слабой клеточной реакцией вокруг (рис. 2 Д, Е).

Обсуждение

Обнаружение на 12-е сутки в области поврежденной кости даже минимального количества ЭМВ ММСК свидетельствует, что не все ЭМВ ММСК сразу оказываются в клетках-мишенях или разрушаются в месте введения и не все ЭМВ ММСК мигрируют из регенерирующей костной ткани. ЭМВ ММСК, по крайней мере, частично сохраняются у кроликов в месте применения не менее 12 дней. Захват ЭМВ ММСК клеточными элементами реципиента происходит постепенно, и, таким образом, влияние этих ЭМВ ММСК на регенерирующую кость растянуто по времени.

Разный размер найденных объектов как раз является доказательством обнаружения искомым ЭМВ ММСК: согласно литературным данным, экзосомы имеют диаметр 50-100 нм [2], а эктосомы — 50-1000 нм [3], то есть ЭМВ ММСК даже одного происхождения имеют очень сильно различающиеся размеры.

Краситель Vybrant® CM-Dil связывается с мембранными структурами, а так как ЭМВ ММСК содержат различное количество мембран, то и флуоресценция ЭМВ ММСК, обусловленная Vybrant® CM-Dil, должна иметь разную интенсивность, связанную с общим объемом мембранных структур. Также необходимо учитывать возможность слипания, агглютинации ЭМВ ММСК, так как описано хорошее связывание эктосом с факторами свертывания крови и формированием протромбиназного комплекса [4].

Элиминация ЭМВ ММСК, по-видимому, происходит как вследствие миграции по сосудистому руслу (ЭМВ ММСК иногда были расположены непосредственно в просвете сосудов (рис. 1 Е)), так и вследствие фагоцитоза макрофагами, каковыми, по всей видимости, и являются крупные клеточные элементы с флуоресцирующими красным цветом включениями.

Заключение о макрофагальном происхождении таких крупных клеток сделано на основании нескольких причин.

1. Размер клеток. Только очень немногие из них превышают 20 мкм; среди таких клеточных элементов — макрофаги.

2. Неправильная форма клеток.

3. Наличие множества разнокалиберных включений, которые, скорее всего, являются лизосомами.

В таком случае светящиеся включения в макрофагах являются фагосомами, флуоресцирующими за счет поглощенных из тканей ЭМВ ММСК. В литературе есть данные о возможности люминесценции фагоцитов за счет адсорбированного флуоресцентного материала [12]. При этом нельзя исключить и окрашивание мембран макрофагов, в том числе фагосом, Vybrant® CM-Dil, освободившимся после лизиса ЭМВ ММСК. Следует учитывать и возможность фагоцитоза ЭМВ ММСК макрофагами вместе с детритом другого происхождения, по-видимому, этим и объясняется разная насыщенности оттенок красного цвета в свечении некоторых макрофагов в месте хирургического вмешательства (рис. 1 Ж, З).

Макрофагальный фагоцитоз приводит не только к деструкции поглощенных ЭМВ ММСК, не исключено, что, оказавшись в макрофагах, ЭМВ ММСК оказывают влияние и на сами фагоциты, меняя их активность и функции.

В контроле на 12-е сутки заметно, что регенерация надкостницы и мягких тканей вокруг моделированного дефекта идет быстрее, чем кости мышелка. Это приводит к срастанию надкостницы (процесс еще продолжается, о чем свидетельствуют грануляции) и окружающих мягких тканей над остающимся костным дефектом. Визуально это может выглядеть как полное заживление, но прочность кости в таких участках будет значительно снижена вследствие остающегося дефекта. Дефект также регенерирует, на что указывают рубцово измененные фрагменты кости на периферии отверстия и отдельные костные структуры внутри его, но репаративные процессы идут медленно.

Введение ЭМВ ММСК крысы в дефект костной ткани кроликов приводит к ускорению ее регенерации и формированию более тонкой костной мозоли. Такое действие ЭМВ ММСК может быть связано с различными гипотетическими причинами.

1. ЭМВ ММСК вследствие иммуномодуляторного влияния могут снижать интенсивность воспаления [13]. При этом, в случае асептического воспаления, инициированного только повреждением тканей, будет меньше объем деструкции, соответственно, раньше начнутся процессы репарации и быстрее будет сформирована костная ткань в дефекте.

2. ЭМВ ММСК могут стимулировать функциональную активность иммунокомпетентных клеток, что должно привести к более быстрой

репарации в результате активного очищения дефекта от детрита.

3. ЭМВ ММСК могут связываться с матричными белками, такими как коллаген типа I и фибронектин, что, кроме всего прочего, способствует ускоренному и четко направленному дифференцированию собственных МСК костной ткани и надкостницы в направлении остеобластов [6, 9, 10]. Это может явиться причиной как увеличения численности остеобластов в дефекте, так и быстрого формирования последними полноценных костных балок.

4. ЭМВ ММСК могут стимулировать пролиферацию и некоторые функции остеобластов [7], что также приведет к более быстрому образованию ими структур кости в дефекте.

В 1 случае из 4, после введения ЭМВ ММСК и более медленной регенерации кости, чем в контроле, в области дефекта были обнаружены нелизированные крупные фрагменты нежизнеспособной кости. Отверстие было заполнено рыхлой неоформленной соединительной тканью с большим числом тонкостенных сосудов (грануляции). Рядом с такой соединительной тканью были расположены бесструктурные гетерогенные слабобазофильные фрагменты с неровными краями, куда врастала эта соединительная ткань. В середине костного детрита присутствовали лакуны с такой же соединительной тканью. По краю дефекта, где была расположена жизнеспособная кость, отмечено формирование грубого костного рубца с бесформенными балками и большими полостями, заполненными гомогенным слабоэозинофильным веществом.

При водяном охлаждении бора во время моделирования дефекта костные фрагменты с потоком жидкости удаляются (вымываются) из раны. По-видимому, в данном случае этого не произошло, так как отломок или отломки оказались в силу каких-то причин слишком крупными. Не исключено и некротизирование края созданного дефекта с последующей секвестрацией на какой-то срок после операции. В любом случае присутствие крупных нежизнеспособных костных секвестров препятствует регенерации дефекта независимо от применения ЭМВ ММСК. Заживление моделированного отверстия в кости произойдет или после лизиса костного детрита, или после элиминации его наружу через открывшийся свищевой ход по типу остеомиелита. В данном случае наиболее вероятен лизис нежизнеспособной кости, на что указывает отсутствие нейтрофильной инфильтрации, плотное присоединение соединительной ткани с грануляциями к краю некротизированных

фрагментов и прорастание в их середине этой соединительной ткани.

К 21-м суткам эксперимента было найдено, что в контроле полное заживление наступило в 40% случаев, а после использования ЭМВ ММСК — в 80%.

Обнаружение инородных структур, сходных с кристаллическими образованиями в тканях в области моделированного отверстия (рис. 2 Д, Е), может служить косвенным признаком присутствия в прошлом нежизнеспособных костных отломков, образованных во время создания дефекта и не удаленных из раны в процессе омыwania охлаждающим физиологическим раствором. По мере лизиса такой некротизированной кости некоторые соединения кальция могут кристаллизоваться и таким образом стать недоступными к поглощению фагоцитами (остеокластами) и препятствовать репарации костного дефекта.

Так как хирургическое вмешательство с заполнением дефекта кости физиологическим раствором или ЭМВ ММСК выполнялось одновременно, однотипно, одним и тем же исследователем и с применением идентичного инструментария, можно предположить, что крупные нежизнеспособные фрагменты кости присутствуют в каждой операционной ране в опыте и контроле, в среднем, с одинаковой частотой и одинаковым количеством.

Однако регенерация тканей как на сроке в 12 дней, так и на 21-е сутки намного чаще (успешнее) произошла после введения в дефект кости ЭМВ ММСК. То есть ЭМВ ММСК ускоряют не только регенерацию раны, но и элиминацию из нее частиц некротизированной кости. Причем ускорение репарационных процессов может быть осуществлено именно за счет более быстрого и эффективного удаления детрита.

Согласно литературным данным, микровезикулы, полученные из МСК человека, содержат значительное количество ангиопоэтина-1 и, возможно, других проангиогенных факторов [13]. То есть применение ЭМВ ММСК может стимулировать развитие сосудистой сети в месте применения, в том числе грануляций. Более быстрое развитие грануляций способствует раннему очищению раны, в том числе и моделированного костного, дефекта и, соответственно, заживлению.

Заключение

Таким образом, предварительные результаты применения ЭМВ ММСК для регенерации дефекта костной ткани в эксперименте свидетельствуют о более эффективном очищении

послеоперационной раны, ее быстром заживлении, увеличении частоты успешной регенерации поврежденной кости и формировании там менее грубой костной мозоли. Однако, эти данные получены на малом количестве экспериментальных животных, и для точного заключения требуется проведение полномасштабных исследований с необходимым числом точек наблюдения и достаточным размером вариационных рядов. У кроликов ЭМВ ММСК присутствуют в тканях в месте применения не менее 12 суток, и их можно, при соответствующей метке, зарегистрировать методами световой микроскопии. То есть ускорение регенерации дефекта костной ткани связано именно с длительным местным действием ЭМВ ММСК. Элиминация не попавших в клетки-мишени ЭМВ ММСК из места введения происходит посредством макрофагального фагоцитоза и, возможно, через сосудистое русло.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2017-2020 гг. (VI.62.2.1, 0309-2016-0006) “Разработка технологий получения материалов для регенеративной медицины и развитие методов восстановления репродуктивного здоровья”.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этические аспекты.

Одобрение комитета по этике

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Takeda YS, Xu Q. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135111. doi: 10.1371/journal.pone.0135111
2. Wu Y, Huang Q, Bu S. Cross talk between exosomes and pancreatic -cells in diabetes. *Arch Physiol Biochem*. 2020 Jul 8;1-10. doi: 10.1080/13813455.2020.1760303. Online ahead of print.
3. Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai, Iba T, Reich J, Nagaoka I. Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates a murine sepsis model via the induction of microvesicle release from neutrophils. *Innate Immun*. 2020 Jun 29;1753425920936754. doi: 10.1177/1753425920936754. Online ahead of print.
4. Silachev DN, Goryunov KV, Shpilyuk MA, Beznoschenko OS, Morozova NY, Kraevaya EE, Popkov VA, Pevzner IB, Zorova LD, Evtushenko EA, Starodubtseva NL, Kononikhin AS, Bugrova AE, Evtushenko EG, Plotnikov EY, Zorov DB, Sukhikh GT. Effect of mscs and msc-derived extracellular vesicles on human blood coagulation. *Cells*. 2019 Mar 19;8(3). pii: E258. doi: 10.3390/cells8030258
5. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, Chaput N, Chatterjee D, Court FA, Del Portillo HA, O'Driscoll L, Fais S, Falcon-Perez JM, Felderhoff-Mueser U, Fraile L, Gho YM, Görgens A, Gupta RC, Hendrix A, Hermann DS, Hill AF, Hochberg F, Horn PA, de Kleijn D, Kordelas L, Kramer BW, Krämer-Albers EM, Laner-Plamberger S, Laitinen S, Leonardi T, Lorenowicz MJ, Lim SK, Lötvall J, Maguire CA, Marcilla A, Nazarenko I, Ochiya T, Patel T, Pedersen S, Pocsfalvi G, Pluchino S, Quesenberry P, Reischl IG, Rivera FJ, Sanzenbacher R, Schallmoser K, Slaper-Cortenbach I, Strunk D, Tonn T, Vader P, van Balkom BW, Wauben M, Andaloussi SE, Théry C, Rohde E, Giebel B. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. Dec 31;4:30087. doi: 10.3402/jev.v4.30087. eCollection 2015.
6. Narayanan R, Huang CC, Ravindran S. Hijacking the cellular mail: exosome mediated differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3808674. doi: 10.1155/2016/3808674
7. Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Dec;5(12):1620-30. doi: 10.5966/sctm.2015-0285
8. Майбородин ИВ, Матвеева ВА, Колесников ИС, Дровосеков МН, Тодер МС, Шевела АИ. Влияние аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения на регенерацию поврежденной кости нижней челюсти крыс. *Стоматология*. 2012;91(1):5-8. <https://www.mediasphera.ru/issues/stomatologiya/2012/1/030039-1735201211>
9. Zhang S, Chu WC, Lai RC, Lim SK, Hui JH, Toh WS. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Dec;24(12):2135-40. doi: 10.1016/j.joca.2016.06.022
10. Wang KX, Xu LL, Rui YF, Huang S, Lin SE, Xiong JH, Li YH, Lee WY, Li G. The effects of secretion factors from umbilical cord derived mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3):e0120593. doi: 10.1371/journal.pone.0120593. eCollection 2015.
11. Torreggiani E, Perut F, Roncuzzi L, Zini N, Baglioni SR, Baldini N. Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity. *Eur Cell Mater*. 2014 Sep 22;28:137-51; discussion 151. doi: 10.22203/ecm.v028a11
12. Lei L, Tzekov R, Tang S, Kaushal S. Accumulation and autofluorescence of phagocytized rod outer segment material in macrophages and microglial cells. *Mol Vis*. 2012;18:103-13. <http://www.molvis.org/molvis/v18/a13>
13. Tang XD, Shi L, Monsel A, Li XY, Zhu HL, Zhu YG, Qu JM. Mesenchymal Stem Cell Microvesicles Attenuate Acute Lung Injury in Mice Partly Mediated by Ang-1 mRNA. *Stem Cells*. 2017 Jul;35(7):1849-59. doi: 10.1002/stem.2619

REFERENCES

1. Takeda YS, Xu Q. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135111. doi: 10.1371/journal.pone.0135111
2. Wu Y, Huang Q, Bu S. Cross talk between exosomes and pancreatic β -cells in diabetes. *Arch Physiol Biochem*. 2020 Jul 8;1-10. doi: 10.1080/13813455.2020.1760303. Online ahead of print.
3. Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai, Iba T, Reich J, Nagaoka I. Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates a murine sepsis model via the induction of microvesicle release from neutrophils. *Innate Immun*. 2020 Jun 29;1753425920936754. doi: 10.1177/1753425920936754. Online ahead of print.
4. Silachev DN, Goryunov KV, Shpilyuk MA, Beznoschenko OS, Morozova NY, Kraevaya EE, Popkov VA, Pevzner IB, Zorova LD, Evtushenko EA, Starodubtseva NL, Kononikhin AS, Bugrova AE, Evtushenko EG, Plotnikov EY, Zorov DB, Sukhikh GT. Effect of mscs and msc-derived extracellular vesicles on human blood coagulation. *Cells*. 2019 Mar 19;8(3). pii: E258. doi: 10.3390/cells8030258
5. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, Chapat N, Chatterjee D, Court FA, Del Portillo HA, O'Driscoll L, Fais S, Falcon-Perez JM, Felderhoff-Mueser U, Fraile L, Gho YS, Görgens A, Gupta RC, Hendrix A, Hermann DM, Hill AF, Hochberg F, Horn PA, de Kleijn D, Kordelas L, Kramer BW, Krämer-Albers EM, Laner-Plamberger S, Laitinen S, Leonardi T, Lorenowicz MJ, Lim SK, Lötvald J, Maguire CA, Marcilla A, Nazarenko I, Ochiya T, Patel T, Pedersen S, Pocsfalvi G, Pluchino S, Quesenberry P, Reischl IG, Rivera FJ, Sanzenbacher R, Schallmoser K, Slaper-Cortenbach I, Strunk D, Tonn T, Vader P, van Balkom BW, Wauben M, Andaloussi SE, Théry C, Rohde E, Giebel B. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. Dec 31;4:30087. doi: 10.3402/jev.v4.30087. eCollection 2015.
6. Narayanan R, Huang CC, Ravindran S. Hijacking the cellular mail: exosome mediated differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3808674. doi: 10.1155/2016/3808674
7. Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Dec;5(12):1620-30. doi: 10.5966/sctm.2015-0285
8. Maiborodin IV, Matveeva VA, Kolesnikov IS, Drovosekov MN, Toder MS, Shevela AI. The effect of autologous mesenchymal stem cells of bone marrow origin on regeneration of damaged rat bottom jaw bone. *Stomatologiya*. 2012;91(1):5-9. <https://www.mediasphera.ru/issues/stomatologiya/2012/1/030039-1735201211> (In Russ.)
9. Zhang S, Chu WC, Lai RC, Lim SK, Hui JH, Toh WS. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Dec;24(12):2135-40. doi: 10.1016/j.joca.2016.06.022
10. Wang KX, Xu LL, Rui YF, Huang S, Lin SE, Xiong JH, Li YH, Lee WY, Li G. The effects of secretion factors from umbilical cord derived mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3):e0120593. doi: 10.1371/journal.pone.0120593. eCollection 2015.
11. Torreggiani E, Perut F, Roncuzzi L, Zini N, Baglmo SR, Baldini N. Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity. *Eur Cell Mater*. 2014 Sep 22;28:137-51; discussion 151. doi: 10.22203/ecm.v028a11
12. Lei L, Tzekov R, Tang S, Kaushal S. Accumulation and autofluorescence of phagocytized rod outer segment material in macrophages and microglial cells. *Mol Vis*. 2012;18:103-13. <http://www.molvis.org/molvis/v18/a13>
13. Tang XD, Shi L, Monsel A, Li XY, Zhu HL, Zhu YG, Qu JM. Mesenchymal Stem Cell Microvesicles Attenuate Acute Lung Injury in Mice Partly Mediated by Ang-1 mRNA. *Stem Cells*. 2017 Jul;35(7):1849-59. doi: 10.1002/stem.2619

Адрес для корреспонденции

630090, Российская Федерация,
г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, д. 8,
Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН,
Центр новых медицинских технологий,
тел.: +7-913-753-0767,
e-mail: imai@mail.ru,
Майбородин Игорь Валентинович

Сведения об авторах

Майбородин Игорь Валентинович, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории технологий управления здоровьем, Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация.
<http://orcid.org/0000-0002-8182-5084>
Шевела Александр Андреевич, к.м.н., докторант лаборатории технологий управления здоровьем, Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация.

Address for correspondence

630090, Russian Federation,
Novosibirsk, pr. Acad. Lavrenteva, 8,
Institute of Chemical Biology
and Fundamental Medicine,
Center for New Medical Technologies
tel. +7-913-753-0767
e-mail: imai@mail.ru,
Maiborodin Igor V.

Information about the authors

Maiborodin Igor V., MD, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Health Management Technologies, the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.
<http://orcid.org/0000-0002-8182-5084>
Shevela Aleksandr A., PhD, Doctoral Student of Laboratory of Health Management Technologies, the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch,

<http://orcid.org/0000-0001-9235-9384>

Марчуков Сергей Вадимович, к.м.н., докторант лаборатории технологий управления здоровьем, Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-7381-5820>

Морозов Виталий Валерьевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией технологий управления здоровьем, Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-9810-5593>

Матвеева Вера Александровна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории технологий управления здоровьем, Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-8706-4853>

Майбородина Виталина Игоревна, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктурных основ патологии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины Министерства науки и высшего образования РФ, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<http://orcid.org/0000-0002-5169-6373>

Новиков Алексей Михайлович, врач-гинеколог, отделение гинекологии, АО «Авиценна», г. Новосибирск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0003-1371-7492>

Шевела Андрей Иванович, д.м.н., профессор, заведующий отделом, Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<http://orcid.org/0000-0002-3164-9377>

Novosibirsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0001-9235-9384>

Marchukov Sergey V., PhD, Doctoral Student of Laboratory of Health Management Technologies, the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-7381-5820>

Morozov Vitaly V., MD, Professor, Head of Laboratory of Health Management Technologies, the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-9810-5593>

Matveeva Vera A., PhD, Senior Researcher of Laboratory of Health Management Technologies, the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-8706-4853>

Maiborodina Vitalina I., MD, Leading Researcher, Laboratory of Ultrastructural Basis of Pathology, Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal State Budget Scientific Institution "Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine", Novosibirsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0002-5169-6373>

Novikov Alexey M., Gynecologist of the Department of Gynecology, JSC Medical Center "Avicenna", Novosibirsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0003-1371-7492>

Shevela Andrey I., MD, Professor, Head of Department the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0002-3164-9377>

Информация о статье

Поступила 16 января 2020 г.

Принята в печать 27 июля 2020 г.

Доступна на сайте 1 сентября 2020 г.

Article history

Arrived: 16 January 2020

Accepted for publication: 27 July 2020

Available online: 1 September 2020